

DIE OPSONINWIRKUNG
VON DREI SERUMKONSERVEN
UND VIER INTRAVENÖS ANWENDBAREN
GAMMAGLOBULINPRÄPARATEN
BEI DER IN-VITRO PHAGOCYTOSE
VON STAPHYLOCOCCUS AUREUS
DURCH MENSCHLICHE GRANULOCYTEN

Achim Krause

*Diss.
München
1956*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554629_0022

AUS DER KINDERPOLIKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROF.DR.MED. H. SPIESS

DIE OPSONINWIRKUNG VON DREI SERUMKONSERVEN UND VIER
INTRAVENÖS ANWENDBAREN GAMMAGLOBULINPRÄPARATEN BEI DER
IN-VITRO PHAGOCYTOSE VON STAPHYLOCOCCUS AUREUS DURCH
MENSCHLICHE GRANULOCYTEN

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG - MAXIMILIAN - UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
ACHIM KRAUSE
AUS MÜNCHEN

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilian-Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. C.E. Pilars de Pilar
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. H. Spiess
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.3.1986

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Einleitung</u>	1
2.	<u>Material und Methoden</u>	4
2.1.	Keim Staphylococcus aureus	
2.2.	Granulocyten	
2.3.	Gewinnung von Frischserum, Antikörper-absorbiertem Serum und inaktiviertem Serum aus dem venösen Vollblut von gesunden Versuchspersonen	
2.4.	Serumeiweißkonserven und Gammaglobulinpräparate	
2.5.	Phagocytose : Vor- und Hauptversuche	
2.6.	Methode der Versuchsauswertung	
3.	<u>Ergebnisse</u>	13
3.1.	Vorversuche	
3.1.1.	Bestimmung des geeigneten Verhältnisses von Keimzahl zu Granulocytenmenge und der geeigneten Phagocytosedauer	
3.1.2.	Bestimmung derjenigen Komplementmenge, die zu einer deutlich beobachtbaren Steigerung der Opsoninwirkung von inaktiviertem Serum führt	
3.1.3.	Vergleich zwischen Vorinkubation und gleichzeitiger Inkubation	

3.2.	Hauptversuche mit Testung der Handelspräparate	
3.2.1.	Untersuchung der Serumkonserven	
3.2.2.	Untersuchung der Gammaglobulin- präparate in physiologischer Konzentration	
3.2.3.	Untersuchung der Gammaglobulin- präparate in 5%-iger Konzentration	
4.	<u>Diskussion</u>	29
4.1.	Diskussion von Material und Methode	
4.2.	Diskussion der Ergebnisse	
5.	<u>Zusammenfassung</u>	40
6.	<u>Literatur</u>	42

1. Einleitung

Die Substitutionsbehandlung mit Gammaglobulinen bei Patienten mit angeborenem Antikörpermangelsyndrom ist seit der Erforschung dieser Krankheit durch Bruton 1952 eine eingeführte Maßnahme, über deren Effektivität zur Prophylaxe von Infektionen viele Studien vorliegen. Unklarheit herrscht jedoch über den Nutzen einer solchen Behandlung bei schweren bakteriellen Infektionen von bislang immunologisch gesunden Personen als Substitutionstherapie bei Verdacht auf sekundären Antikörpermangel. Bei dieser Indikation ist es sinnvoll, ausreichend schnell einen suffizienten Blut- und Gewebespiegel von Immunglobulinen mit den benötigten Antikörpern zu erzielen, die ihrerseits in ihrer Funktionsfähigkeit möglichst wenig beeinträchtigt sind.

Weil dieses Ziel mit den zur i.m. Applikation geeigneten 16%-igen Standardglobulinpräparaten nicht immer erreicht werden kann, wurden Zubereitungen entwickelt, bei denen die massiven Nebenwirkungen, die die intravenöse Gabe von Standardimmunglobulinen auslösen kann, vermieden werden (3).

Bei den Aufbereitungen zur intravenösen Anwendung sind durch enzymatische Spaltung (durch Pepsin oder Plasmin) oder aber durch chemische Modifikation (z.B. durch β -Propiolacton, Polyäthylenglykol und Hydroxyäthylstärke oder Säurebehandlung bei pH 4) Modifikationen am Immunglobulinmolekül vorgenommen worden, die eine unspezifische Komplementaktivierung mit den möglichen Folgen bis hin zu schockähnlichen Krankheitsbildern verhindern sollen.

Die intravenöse Zufuhr von Immunglobulinen ist neben der Gabe von reinen Immunglobulinpräparationen auch durch Plasmaprodukte wie fresh frozen plasma (FFP), lyophilisiertem Plasma , Vollblut und Serumkonserven möglich. Dieses Vorgehen wurde wiederholt empfohlen (5, 11, 14, 25).

Anwendung finden die Serumkonserven in der Pädiatrie bei

Frühgeborenen (50,59), deren Granulocyten weitgehend die volle Leistungsfähigkeit besitzen (66), deren Immunglobulinspiegel jedoch abhängig vom Gestationsalter vermindert ist (51).

Der Vorteil der Serumkonserven liegt in der guten Verträglichkeit und darin, daß sie alle Gruppen von Immunglobulinen enthalten, also auch das IgM, das eine deutlich höhere Affinität zu einigen Antigenen zeigt als IgG (11,22,70). Über die funktionelle Vollwertigkeit des enthaltenen IgM gibt es jedoch außer serologischen Tests keine Beweise. Daneben verfügen Serumkonserven auch über bakterizidiefördernde Substanzen wie Transferrin (6,50). Außerdem sollen sie durch die Aufbereitungsprozesse geringer alteriert sein.

Der Nachteil besteht in der höheren Volumenbelastung bei Substitution einer ausreichenden Menge von Immunglobulinmolekülen: Die Serumkonserven sind mit 1%igem bzw. 2%igem Immunglobulinspiegel weniger konzentriert als die 5%igen Gammaglobulinpräparate. Außerdem ist bei einigen das Hepatitisrisiko nicht völlig beseitigt (5).

Literatur über den tatsächlichen Nutzen der Gabe von Serumkonserven bei schweren bakteriellen Infektionen ist jedoch rar (6), in-vitro Untersuchungen liegen nicht vor.

Zur Prüfung der Wirksamkeit von intravenösen Gammaglobulinen gibt es klinische Studien. Dabei wurden Präparate verschiedener Aufbereitungsweisen eingesetzt: β -Propiolacton-IgG (14,57), pepsingespaltene IgG (52) und PEG/HES-behandeltes IgG (58).

Eine Senkung der Häufigkeit schwerer allgemeiner bakterieller Infektionen nach Operationen bzw. Chemotherapie und Strahlenbehandlung wurde bei prophylaktischer Gabe von Immunglobulinen beobachtet. Auffällig ist jedoch, daß in diesen Studien jeweils recht hohe Dosierungen zum Einsatz kamen und daß sich auch nur eine hohe Dosis als wirksam erwies (14). Statistisch war nur eine Senkung der Pneumonierate nachweisbar.

Es stellt sich also die Frage, inwieweit die Gammaglobuline der handelsüblichen Präparate, d.h. auch die angeblich nativ -belassenen , in ihrer biologischen Leistungsfähigkeit beeinträchtigt sind oder ob störende Faktoren in den Präparaten die an sich erhaltene Funktionstüchtigkeit der enthaltenen Immunglobuline abschwächen, z.B. durch Aggregatbildung.

Daher soll nun eine vergleichende Untersuchung durchgeführt werden, die den Einfluß von handelsüblichen gammaglobulinhaltigen Präparaten auf die Phagocytose häufiger pathogener Keime durch menschliche Granulocyten in einem in-vitro Modell erkennen läßt. Verglichen wird die Phagocytoseförderung durch intravenös anwendbare Gammaglobuline mit der entsprechenden Fähigkeit von Serumkonserven. Als weiterer Bezugspunkt dient dabei die Begünstigung der Phagocytose durch inaktiviertes Serum. Die Phagocytoseversuche werden parallel mit dem gramnegativen Keim *Escherichia coli* (11), dem Pilz *Candida albicans* (48) und dem grampositiven Keim *Staphylococcus aureus* vorgenommen.

In der vorliegenden Arbeit werden die mit *S.aureus* durchgeführten Versuche vorgestellt. Dieser Keim wurde als grampositives Bakterium ausgewählt, weil er einen der häufigsten Hospitalkeime darstellt und über ihn bereits Ergebnisse von Phagocytosetests vorliegen (9,16,23,39,46,60,73).

In dieser Untersuchung sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Können die Präparate entsprechend ihrem Immunglobulingehalt die Phagocytose des Testkeims durch Opsonisierung fördern?
2. Wie ist die Leistungsfähigkeit der Präparate im Vergleich zu der von frischem menschlichen Serum bzw. von inaktiviertem Serum?

Hierbei gewinnt die Geschwindigkeit, mit der die Opsonisierung abläuft eine besondere Bedeutung. Auch bei Infektionen ist es für den weiteren Krankheitsverlauf wichtig, welcher Vorgang schneller verläuft: Die

Eliminierung der pathogenen Keime oder aber ihre Vermehrung.

3. Können die Präparate zugegebene Komplementfaktoren als zusätzliche Opsoninquelle zur Phagocytoseförderung verwerten?

2. Material und Methoden

2.1. Keim Staphylococcus aureus (S.aureus)

Ein Stamm von S.aureus aus klinischem Untersuchungsmaterial wird in Standard 2-Bouillon (Fa. Merck Art.Nr. 7884) bei 37°C 18 Stunden inkubiert. Anschließend wird die Bouillon dreimal mit NaCl 0,9% ausgewaschen.

Die Abtötung der Keime vor Versuchsbeginn erfolgt mit Ampicillin (Fa. Oxoid) 30µg/ml über 45 Minuten bei 37°C. Die Keime werden auf eine Konzentration von $2 - 3 \times 10^5/\mu\text{l}$ verdünnt. Die im einzelnen gewählte genaue Verdünnung richtet sich nach der jeweiligen Granulocytenkonzentration im Vollblut und wird so eingestellt, daß die notwendige Keimzahl für die gewünschten Keim-zu-Granulocyten-Relationen in 100 µl der Suspension enthalten ist. Keimagglutinate werden wieder aufgelöst, indem die Suspension mit einer Spritze durch eine feine Kanüle gepreßt wird. Die Bestimmung der tatsächlichen Keimkonzentration und die gleichzeitige Kontrolle über die Auflösung von Keimagglutinaten erfolgt anschließend in der Neubauerkammer.

2.2. Granulocyten

Es wird heparinisiertes venöses Vollblut (5 IE Heparin / ml) einer gesunden Versuchsperson gewonnen. Die korpuskulären Bestandteile werden soweit möglich belassen, das Plasma weitgehend ausgewaschen: jeweils 1ml Vollblut wird zweimal

in einer Lösung von Hank's Puffer (mit Ca^{++} und Mg^{++}) und 20% fetalem Kälberserum (Grand Island Biological Company) in silikonisierten Reagenzgläsern gewaschen. Hämolyse, Adhäsion und Agglutination werden durch die Silikonisierung und den Zusatz von fetalem Kälberserum verhindert (40).

Durch den wiederholten Waschvorgang ist die Ausgangsmenge von Plasma bzw. Heparin bei dem gewählten Ansatz:

- 1ml Vollblut
- + 8ml Waschlösung (Hank's Lösung und fetales Kälberserum)
- Zentrifugieren bei 160 g über 7 Minuten
- 8ml Überstand, der abpipettiert und verworfen wird
- + 8ml Waschlösung
- Zentrifugieren bei 160 g über 7 Minuten
- 8,3ml Überstand

auf maximal 0,35% vermindert. Diese Lösung weist bei einer auf 15 Minuten begrenzten Phagocytosedauer kaum eine eigene Opsonisierungsfähigkeit auf (16). Die Methode entspricht weitgehend dem von Lehrer angegebenen Vorgehen (33).

Die Granulocytenkonzentration wird aus der Leukocytenkonzentration (Bestimmung in der Neubauerkammer nach Lysieren der Erythrocyten in 1%iger Essigsäure) und dem Differenzialblutbild ermittelt.

Da für den Phagocytoseversuch im hier beschriebenen Modell die anderen Blutzellen nicht (z.B. durch Sedimentieren in Dextran) entfernt werden, ist in 500 μ l der gewaschenen Blutzellen in etwa die gleiche Menge Zellen enthalten wie in 1ml Vollblut. Die aktuellen Hämatokritwerte werden bei der Blutabnahme mitbestimmt.

Die Granulocyten werden jeweils frisch gewonnen; zwischen der entsprechenden Blutabnahme und dem Beginn der Phagocytoseversuche verstreicht etwa 1 Stunde.

2.3. Gewinnung von Frischserum (FS), Antikörper-adsorbiertem Serum (C') und inaktiviertem Serum (I) aus dem venösen Vollblut von gesunden Versuchspersonen

Die Gewinnung von Frischserum erfolgt laborüblich:

Eine halbe Stunde nach Abnahme bei Zimmertemperatur wird das Blut kühlzentrifugiert. Das Serum wird entweder gleich verwendet (maximal nach 2 Stunden) oder bei -60°C tiefgekühlt und kurz vor Gebrauch aufgetaut.

Gewinnung des Antikörper-adsorbierten, komplementhaltigen Serums (C'): 1000 μl Frischserum werden mit in 0,9% NaCl gewaschenen S.aureus (Konzentration 10^9 Keime/ml) mindestens 2 Stunden bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird das Serum durch Abzentrifugieren des Keims (Eppendorfszentrifuge, 2 x 2 Minuten) gewonnen und gleichzeitig auf Zimmertemperatur aufgewärmt. Dieses Vorgehen hält sich weitgehend an das von Solberg beschriebene Verfahren (65). Eine wesentliche Komplementaktivierung während der Adsorption ist bei einer Temperatur von 4°C nicht zu erwarten (24).

Das Antikörper-adsorbierte Serum dient in unseren Versuchsreihen als Kontrollansatz C'. Es wird darüberhinaus bei den Untersuchungen der Präparate im unten beschriebenen Phagocytosemodell als zusätzliche Komplementquelle in einer Menge entsprechend 10 Vol% Plasma in Vollblut zugesetzt. Das Antikörper-adsorbierte Serum wird ebenfalls entweder gleich verwendet (bis maximal 2 Stunden nach Gewinnung) oder tiefgefroren bei -60°C aufbewahrt.

Gewinnung des inaktivierten Serums (I):

Die Inaktivierung der hitzelabilen Serumfaktoren wird durch eine Inkubation des Frischserums bei 56°C über 30 Minuten vorgenommen. Auch dieses Serum wird bis zum Versuchsbeginn tiefgefroren aufbewahrt. Es stammt von mehreren Erwachsenen und wird zu gleichen Teilen gemischt.

2.4. Serumeiweißkonserven und Gammaglobulinpräparate

Von den im Handel befindlichen, gammaglobulinhaltigen Präparaten werden vier Gammaglobulinaufbereitungen zur intravenösen Gabe sowie drei Serumkonserven untersucht. Unter den Gammaglobulinpräparaten finden sich zwei enzymatisch durch Pepsin bzw. Plasmin gespaltene sowie zwei chemisch durch β -Propiolacton bzw. Polyäthylenglykol und Hydroxyäthylstärke (PEG/HES) modifizierte Präparationen (Tab.1).

Durch die entsprechenden Aufbereitungsarten unterscheiden sie sich in den enthaltenen Immunglobulinen (Tab.2).

Die drei verfügbaren Serumkonserven (Tab.3) sind ebenfalls unterschiedlich hergestellt, wobei für eine Konserve (Seretin) nähere Angaben fehlen. Sie differenzieren in der Konzentration von Immunglobulinen sowie weiteren Serumbestandteilen (Tab.4).

Tabelle 1 Gammaglobulinpräparate

Präparat	Vorbehandlung	Chargen-Nr.	Firma
Gammavenin	Pepsin	420 186	Behringwerke AG
		420 210	
Rhodiglobin	Plasmin	N 1119 A	Rhodiapharma
Intraglobin	β -Propiolacton	411 059	Biotest
		411 029	
Immunschura	PEG/HES	80 134	Schura Blutderivate Krefeld, jetzt: Armour Pharma GmbH
		80 135	

Tabelle 2 Biochemische Charakterisierung der Gammaglobulin -
Präparate (5, 42, 55, 69)

	gespalten		ungespalten	
Präparate	Pepsin (Gammavenin)	Plasmin (Rhodiglobin)	β -Propiolacton (Intraglobin)	PEG/HES (Immunschura)
Ig-Klassen	IgA, IgM fehlen	IgA, IgM in Spuren	IgM fehlt IgA in Spuren	IgA, IgM vermindert
IgG-Subklassen	keine Bestimmung	IgG 1 stark vermindert IgG 2 erhöht IgG 3 fehlt	IgG 3 fehlt IgG 4 vermindert	unveränderte Subklassen
Polymere	—	—	5%	10-15%
7 S - IgG	5%	35%	95%	90-95%
F(ab') ₂	85%	—	—	—
Fab / Fc	5%	65%	—	—
pFc	5%	—	—	—

Tabelle 3 Serumkonserven

Präparat	Chargen-Nr.	Firma
Biseko	221 079 224 079	Biotest
Seretin	446 128 446 176	Behringwerke AG
Schura	50 123 50 128	Schura Blutderivate Krefeld ,jetzt: Armour Pharma GmbH

Tabelle 4 Charakterisierung der Serumkonserven
Gehalt an Immunglobulinen (mg/dl), Transferrin,
freier Eisenbindungskapazität (µg/dl) und
Präparationsart (6, 50)

Präparat	Biseko	Seretin	Schura
Präparation	β-Propio- lacton und UV-Bestrahlung	Langzeiter- wärmung sonst keine näheren Angaben	Anreicherung bzw. Konzentration von β- und γ-Globulinen
IgG	1150	950	1975
IgA	190	160	≥ 350
IgM	80	75	235
Tf	220	180	510
freie EBK	65	175	215

2.5. Phagocytose: Vor- und Hauptversuche

In sterilen, silikonisierten Reagenzgläsern werden die Phagocyten, Opsonine und Keime folgendermaßen zusammengebracht:

500 µl	gewaschene Blutzellen
200 µl	Waschlösung (Hank's Lösung + fetales Kälberserum)
	als Überstand
500 µl	Opsoninquelle:
	Serumkonserven
	i.v. Gammaglobuline
	Kontrollmedien
50 µl	absorbiertes Frischserum (C') in den Proben mit zusätzlicher Komplementquelle
100 µl	Staphylococcen-Suspension

Alle Phagocytoseansätze werden gleichzeitig und jeweils doppelt durchgeführt. So sind z.B. für die weiter unten beschriebene Testung von Serumkonserven (siehe 3.2.1.)

20 Ansätze nötig:

8 Kontrollansätze, daneben pro Präparat 4 Ansätze, davon 2 mit und 2 ohne zusätzliche Komplementquelle.

Bei den Versuchen mit Gammaglobulinen (siehe 3.2.2. und 3.2.3.) werden 21 Ansätze benötigt:

5 Kontrollansätze, sowie 4 Testansätze pro Präparat.

Folgende Versuchsansätze dienen als Kontrolle:

1. Hank's Lösung (H)
(Hank's balanced salt solution: pH 7,4, Ca^{++} -Gehalt ca. 6,7 mg%, Mg^{++} -Gehalt ca. 4,6 mg%) als Maß für die Eigenleistung der Granulocyten
2. Absorbiertes und inaktiviertes Serum (C'I) als Maß für die Restantikörper
3. Absorbiertes Serum (C') als Maß für die Opsonisierung durch Komplementfaktoren und Restantikörper
4. Inaktiviertes Serum (I) als Maß für die Opsonisierung durch natürliche Antikörper. Dieser Kontrollansatz dient als Maßstab für die Qualität der Antikörper in den zu testenden Präparaten, insbesondere den Serumkonserven.
5. Frischserum (FS) als Maß für die maximal erreichbare Opsonisierung

Die zugegebene Staphylococcensuspension wird in ihrer Keimkonzentration so eingestellt, daß die gewünschte Granulocyt-zu-Keim-Relation zwischen 1 : 3 und 1 : 5 beträgt. So ergibt sich bei der Zugabe von 100 μl aus der Keimsuspension mit 2×10^5 Keime/ μl , also von 2×10^7 Keimen zu den Blutzellen aus 1ml Vollblut mit 5×10^6 Granulocyten im oben beschriebenen Ansatz eine Relation Granulocyt zu Keim von 1 : 4.

Aus den einzelnen Proben werden nach definierten, unterschiedlichen Zeiten - bei den Hauptversuchen nach 5 und 10 Minuten - Aliquots von 10 - 20 μl entnommen und als "dicker Tropfen" auf einem Objektträger in eine feuchte Kammer (15°C) gebracht, damit die Granulocyten sedimentieren und hängenbleiben. Der temperaturabhängige Phagocytosevorgang kommt hierbei weitgehend zum Erliegen. Nach 45 Minuten werden die Objektträger schräg gestellt (ca. 45°), die überschüssige Flüssigkeit wird vom Rand her abgesaugt. Die Präparate werden getrocknet, hitzefixiert und nach Gram gefärbt.

2.6. Methode der Versuchsauswertung

Pro Präparat werden unter dem Mikroskop bei 1000 -facher Vergrößerung 200 Granulocyten von zwei verschiedenen Beobachtern ausgezählt und die Phagocytoserate bzw. der Phagocytoseindex bestimmt.

Dabei definieren wir folgendermaßen :

$$\text{Phagocytoserate} = \frac{\text{Zahl der Granulocyten, die phagocytiert haben} \times 100}{\text{Gesamtzahl der ausgezählten Granulocyten}} \text{ } ^{\circ}/\text{o}$$

$$\text{Phagocytoseindex} = \frac{\text{Zahl aller phagocytierten Staphylococcen}}{\text{Zahl aller Granulocyten, die phagocytiert haben}}$$

3. Ergebnisse

3.1. Vorversuche

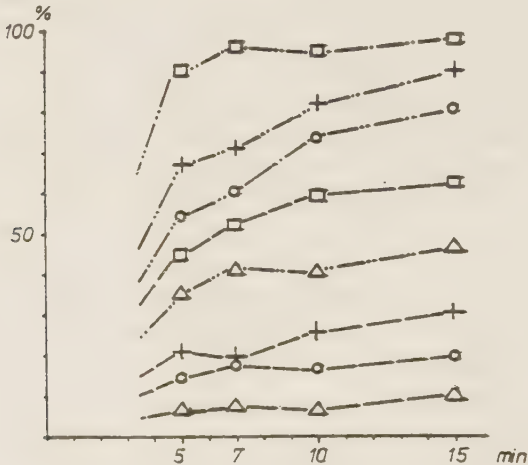
In Vorversuchen soll zunächst über folgende Parameter Klarheit gewonnen werden:

1. Bei welchem Verhältnis von Granulocyt zu Keim sind am deutlichsten Unterschiede in der Leistung der einzelnen Opsoninquellen zu erfassen?
Dazu ist eine möglichst weite Spreizung von Minimalwert (in Hank's Lösung) und Maximalwert (in Frischserum) anzustreben.
2. Zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der einzelnen Opsoninquellen soll der zeitliche Verlauf der Phagocytose erkennbar sein: Ohne Berücksichtigung des Zeitfaktors wird nur die Arbeitsfähigkeit erfaßt, sodaß die Ergebnisse irreführen können.
Dabei stellt sich auch die Frage, ob durch die von einigen Autoren gewählte Vorinkubation von S.aureus in opsonisierenden Seren eine verminderte Avidität der Antikörper verschleiert wird.
3. Mit wieviel Prozent des absorbierten Frischserums als zugegebener Komplementquelle läßt sich eine verbesserte Phagocytose durch inaktiviertes Serum erreichen?
Damit soll eine Aussage über die Fähigkeit der Antikörper des inaktivierten Serums bzw. der zu testenden Präparate möglich werden, Komplement als zusätzliches Opsonin verwerten zu können.

3.1.1. Bestimmung des geeigneten Verhältnisses von Keimzahl zu Granulo - cytenmenge und der geeigneten Phagocytosedauer

Zur Bestimmung des geeigneten Verhältnisses von Keim - zu Granulo - cytenmenge wird *S. aureus* in unterschiedlichen Mengenverhältnissen den Granulocyten zur Phagocytose angeboten. Nach verschiedenen Zeiten erfolgt die Bestimmung der Phagocytoserate. Als Opsoninquellen dienen Frischserum und Hank's Lösung (Abb. 1).

Abb. 1 :



Granulocyt: Keim

- | | |
|--------|-----------------|
| △ 1:1 | --- Frischserum |
| ○ 1:3 | — Hank's Lösung |
| + 1:5 | |
| □ 1:10 | |

Phagocytoserate (Ordinate) nach verschiedenen Inkubationszeiten
(Abszisse) in Abhängigkeit vom Verhältnis Granulocyt zu *S. aureus*.

Bei einem Keim - zu - Granulocytenverhältnis zwischen 3 : 1 und 5 : 1 sowie bei einer Inkubationszeit zwischen 5 und 10 Minuten werden die geforderten Bedingungen, nämlich

1. ein großer Unterschied zwischen der Opsonisierung durch Hank's Lösung und der durch Frischserum
2. bereits auswertbare Phagocytoseleistung in Hank's Medium und noch im Ablauf befindliche Phagocytose im Frischserum

sowie das Fehlen von Staphylococcen- und Granulocytenaggregaten am besten erfüllt. Diese Zeiten und Verhältnisse werden bei den folgenden Hauptversuchen eingehalten. Bei einer Einsaat von 10 Keimen pro Granulocyt ist die Phagocytoserate ohne zugegebenes Opsonin besser bzw. fast gleich wie bei einem Verhältnis von 1 : 1 oder 3 : 1 mit Opsonin. Es ist danach zu vermuten, daß bei einer weiteren Steigerung der Keimzahl auf z.B. 20 S.aureus pro Granulocyt die Bakterien innerhalb von 5 und 10 Minuten ebenso gut ohne Opsoninquelle phagocytiert würden wie mit dem bestmöglichen IgG-Präparat als zusätzlichem Opsonin.

3.1.2. Bestimmung derjenigen Komplementmenge, die zu einer deutlich beobachtbaren Steigerung der Opsoninwirkung von inaktiviertem Serum führt

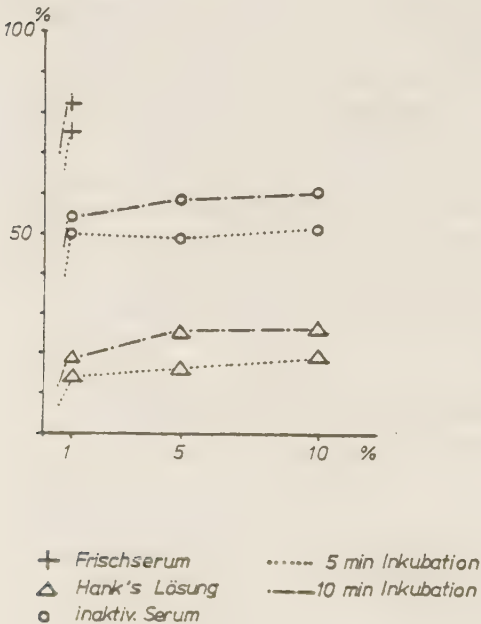
Das antikörperhaltige inaktivierte Serum, dessen Komplementfaktoren durch Hitzebehandlung zerstört werden, entspricht bei diesem Ansatz den Gammaglobulinpräparaten und Serumkonserven, bei denen die hitzelabilen Proteine des Komplementsystems nach dem Aufbereitungsprozeß fehlen.

Wegen der bekannten Koagulasebildung durch S.aureus (2) wird statt Plasma das Antikörper-absorbierte frische Serum als Komplementquelle verwendet.

Versuchsansatz :

- Verhältnis von S.aureus zu Granulocyt wie 4,8 : 1
- Gleichzeitige Inkubation von S.aureus und Granulocysten in Hank's Lösung (Dreieck), inaktiviertem Serum (Kreis) und Frischserum (Kreuz)
- Als Komplementquelle werden 5, 25 und 50µl absorbierten Serums, entsprechend einem 1, 5 und 10 %igen Komplement-zusatz beigefügt
- Inkubationszeit 5 und 10 Minuten, Auswertung wie beschrieben

Abb. 2 :



Phagocytoseraten (Ordinate) in Abhängigkeit von der Komplementkonzentration (Abszisse) bei unterschiedlichen Opsoninquellen und Inkubationszeiten.

Als Versuchsergebnis läßt sich festhalten (siehe Abb. 2) :
S. aureus benötigt bei Anwesenheit intakter Antikörper zur Opsonisierung nicht unbedingt Komplement. Hier unterscheidet sich der Keim von anderen wie z.B. E. coli (12) und Candida albicans (48). Ein Komplementzusatz zwischen 1% und 10% zu inaktiviertem Serum läßt keine wertbare Änderung der Opsonisierung beobachten.

Als Ergebnis dieses Versuchs wird in den Hauptversuchen eine 10%-ige Konzentration absorbierten Frischserums als Komplementzusatz gewählt. Damit wird die Fähigkeit der Präparate zur Komplementverwertung getestet. Diese Konzentration läßt sich im Versuchsansatz auch ausreichend genau einhalten.

3.1.3. Vergleich zwischen Vorinkubation und gleichzeitiger Inkubation

Es soll die Frage beantwortet werden, ob durch eine Vorinkubation von S. aureus in den opsonisierenden Medien Hank's Lösung, Antikörper - absorbiertes Serum, inaktiviertes Serum und Frischserum vor der Einsaat in die Granulocytensuspension die Phagocytose begünstigt wird. Während der Vorinkubation haben Antikörper, die in ihrer Reaktionsfähigkeit beeinträchtigt sind, zusätzliche Zeit , an Keime zu binden und als Opsonin zu wirken. Dieser Versuch soll einen weiteren Aufschluß über den Zeitfaktor bei der Opsonisierung geben, um damit eine Aussage über die Leistung (definiert als Arbeit pro Zeiteinheit) der Opsonine zu ermöglichen.

Versuchsansatz :

Die Vorinkubation einer gewaschenen Staphylococcensuspension erfolgt in den oben genannten Opsoninquellen über eine Dauer von 30 Minuten bei 37°C. Anschließend werden die Keime in Hank's Lösung gewaschen und in den bereits beschriebenen Phagocytoseansatz (siehe 2.5.) eingebracht. Das Verhältnis von S. aureus zu Granulocyten beträgt 4,5 : 1, die Phagocytosezeit 5 und 10 Minuten im 37°C Schüttelwasserbad. Es werden Phagocytoserate und - index bestimmt (Abb. 3a und b).

Abb. 3a : Phagocytoserate

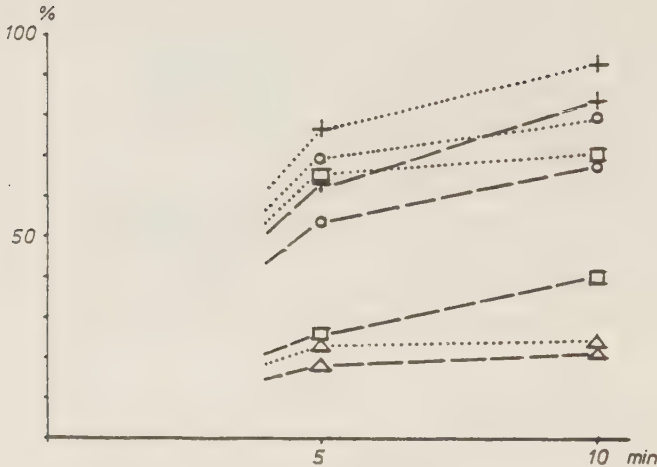


Abb. 3b : Phagocytoseindex



- + Frischserum
- Δ Hank's Lösung
- ◻ absorb. Serum
- inaktiv. Serum
- gleichzeitige Inkubation
- Vorinkubation

Phagocytoseraten (Ordinate in Abb. 3a) und Phagocytoseindices (Ordinate in Abb. 3b) in verschiedenen Opsoninmedien (Frischserum, Hank's Lösung, Antikörper-absorbiertes Serum und inaktiviertes Serum) bei gleichzeitiger Inkubation bzw. Vorinkubation in Abhängigkeit von der Phagocytosezeit (Abszissen).

Für die Hauptversuche sind folgende Aspekte des Vorversuchs wichtig:

Die deutlichste Verbesserung der Phagocytoseparameter durch Vorinkubation findet in Antikörper-adsorbiertem Serum statt. Die Phagocytoserate steigt dabei von 27% auf 65% nach 5 Minuten, von 40% auf 70% nach 10 Minuten. Als Erklärung hierfür ist anzunehmen, daß die geringe Menge an spezifischen, aber natürlichen Antikörpern in der Granulocytensuspension und im Antikörper-adsorbierten Serum bei ausreichend langer Reaktionszeit diesen Nachteil der niedrigen Konzentration wettmachen kann.

Die Opsoninwirkung von Frischserum ist so ausgeprägt, daß die Phagocytoserate bei gleichzeitiger Inkubation schon nach 10 Minuten das Niveau erreicht, das sich im vorinkubierten Ansatz nach fünfminütigem Phagocytoseverlauf ergibt. Ein großer Unterschied ist durch die zusätzliche Reaktionszeit nicht erkennbar: Native Antikörper binden also rasch und nachhaltig an *S. aureus*.

Die Vorinkubation in inaktiviertem Serum bewirkt eine Verbesserung der Keimaufnahme durch Granulocyten. Jedoch besteht auch hier - wie bei Frischserum - kein großer Unterschied zwischen den Werten für vorinkubierte Keime nach 5 Minuten und für gleichzeitig inkubierte nach 10 Minuten Phagocytosedauer: Natürliche Antikörper verfügen offenkundig über eine hohe Avidität.

In Hank's -Milieu zeigt sich keine deutliche Änderung der Phagocytosewerte: Da die vorherige Abtötung der Keime ihre Vermehrung verhindert, kommt es nicht zu einem erhöhten Angebot von z.B. 9:1 statt 4,5:1 Keime je Granulocyt.

Da aber das Ziel dieser Arbeit darin besteht, die Immunglobuline in den Handelspräparaten unter möglichst realistischen Bedingungen auf ihre Vollwertigkeit zu prüfen, wird für die Hauptversuche der Ansatz mit gleichzeitiger Inkubation gewählt: Eine unterschiedliche Avidität der Antikörper in den Zubereitungen stellt sich dadurch vermutlich deutlicher dar.

3.2. Hauptversuche mit Testung der Handelspräparate

In den folgenden Versuchen werden die Phagocytosevorgänge in Handelspräparaten und in Kontrollmedien als jeweilige Opsoninquellen studiert.

3.2.1. Untersuchung der Serumkonserven

Die fördernde Wirkung aller drei Serumkonserven auf die Phagocytoseraten und -indices ist gering. Eine graphische Darstellung der einzelnen Werte geben die Abbildungen 4 a-d wider.

Bei allen Präparaten läßt sich durch die Zugabe von Komplementfaktoren eine Steigerung der jeweiligen Phagocytoserate in etwa gleichem Ausmaß erzielen (plus $6^{\pm} 1\%$ nach 10 Minuten Phagocytosedauer).

Nur die Serumkonserve Schura vermag die Eigenleistung der Granulocyten zu verbessern.

Selbst mit zugesetzten Komplementfaktoren bleiben die Antikörper in dieser Zubereitung den weitgehend intakten Antikörpern in inaktiviertem Serum ohne zusätzliches Komplement unterlegen (minus 17% nach 5 Minuten, minus 25% nach 10 Minuten). Dabei ist zu bedenken, daß diese Konserve im Vergleich zu Normalserum die etwa doppelte Konzentration an IgA, IgM und IgG aufweist.

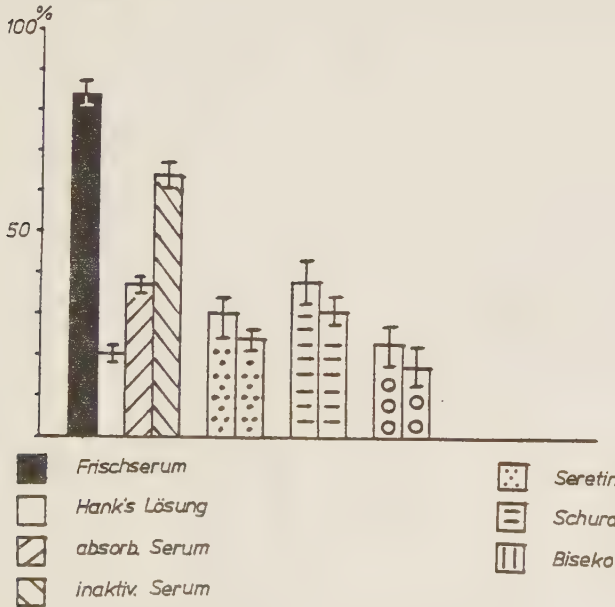
Der Unterschied zwischen der Opsonisierung durch die Antikörper des inaktivierten Serums ohne aktive Komplementfaktoren und durch die anderen beiden Präparate mit Komplementzugabe (Biseko und Seretin) stellt sich noch deutlicher dar. Bei diesen Präparationen bewegen sich die Phagocytoseparameter an der Ober- (Seretin) bzw. Untergrenze (Biseko) der Werte für die opsoninarme Leukocyten suspension in Hank's Lösung. Dies gilt sowohl für eine fünf- als auch für eine zehnminütige Phagocytosedauer.

Frischserum vermittelt in den betrachteten Zeiträumen eine umfassende Phagocytose (75% nach 5 Minuten, 84% nach 10 Minuten). Das inaktivierte Normalserum bewirkt im Vergleich dazu eine 22% bzw. 20% niedrigere Rate.

Abb. 4a : Serumkonserven - Phagocytoserate nach 5 Minuten



Abb. 4b : Serumkonserven - Phagocytoserate nach 10 Minuten



Phagocytoseraten nach 5 Minuten (Abb. 4a) und 10 Minuten (Abb. 4b) in den Kontrollansätzen und bei Serumkonserven. Bei den Präparaten gibt jeweils die linke Säule den Ansatz mit 10% Antikörper - absorbierten Serums als zusätzliche Komplementquelle wider.

Abb. 4c : Serumkonserven - Phagocytoseindex nach 5 Minuten

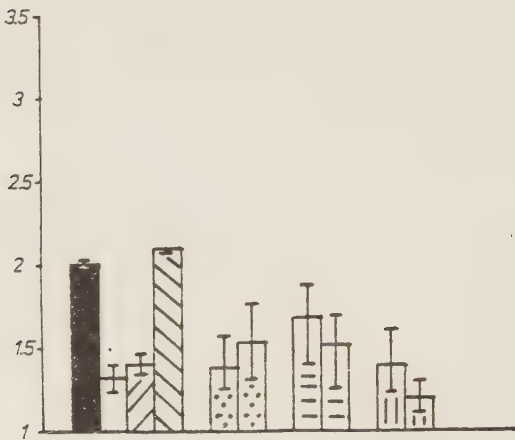
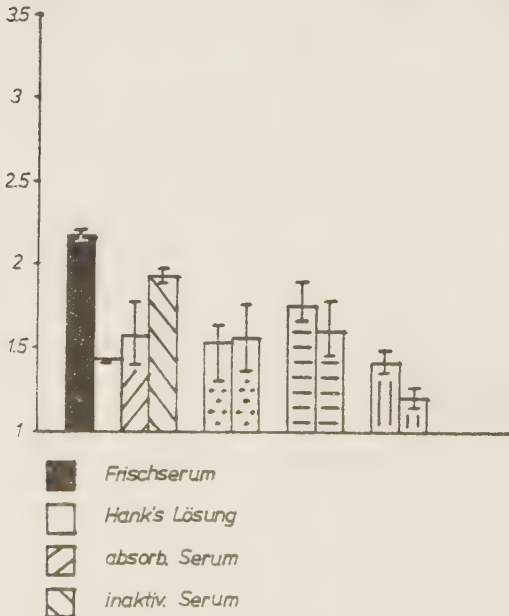


Abb. 4d : Serumkonserven - Phagocytoseindex nach 10 Minuten



Phagocytoseindices nach 5 Minuten (Abb. 4c) und 10 Minuten (Abb. 4d) in den Kontrollansätzen und bei Serumkonserven. Bei den Präparaten stellt jeweils die linke Säule den Ansatz mit 10% Antikörper-absorbiertem Serum als zusätzlicher Komplementquelle dar.

3.2.2. Untersuchung der Gammaglobulinpräparate in physiologischer Konzentration

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit den Gammaglobulinpräparaten sind in Abbildung 5 a-d dargestellt. Dabei sind die therapeutisch in 5%-ige Konzentration aufzulösenden Präparate auf eine in etwa physiologische Endkonzentration von 1000 mg% verdünnt. Noch geringere Dosierungen wie 250 oder 500 mg% waren in Vorversuchen wirkungslos.

Insgesamt findet sich keine Verbesserung der Phagocytose: Kein einziges Präparat zeigt ohne Komplementzusatz die Werte der Granulocyte-eigenleistung. Der Unterschied zwischen den einzelnen Präparaten ist dabei gering. Die Zugabe von 10% Antikörper-adsorbiertem Frischserum führt bei allen Präparaten zu einer gering höheren Phagocytoserate. Diese entspricht dann in etwa der Granulocyte-eigenleistung in Hank's Lösung. Mit der zusätzlichen Komplementquelle wird somit die Verschlechterung durch die Präparate allein wieder aufgehoben.

Bei der Betrachtung der Kontrollansätze mit Hank's Lösung und mit dem sowohl inaktivierten als auch Antikörper-adsorbierten Serum zeigt sich kein bedeutsamer Unterschied: Die Phagocytoseraten für inaktiviertes und adsorbiertes Serum als Opsoninquelle liegen um 3% bzw. 4% über den Werten für Hank's Lösung. Nach Adsorption mit S.aureus verbleibt also nur eine vernachlässigbare Menge von spezifischen Restantikörpern im Serum.

Abb. 5a : Gammaglobuline 1 % - Phagocytoserate nach 5 Minuten



Abb. 5b : Gammaglobuline 1 % - Phagocytoserate nach 10 Minuten



- | | | | | | |
|--|----------------------------|---|-------------|---|-------------|
|  | Frischserum |  | Intraglobin |  | IgG prop |
|  | Hank's Lösung |  | γ-Venin |  | IgG pepsin |
|  | absorb. Serum |  | Schura |  | IgG nativ |
|  | inaktiv. Serum |  | Rhodiglobin | | IgG plasmin |
|  | inaktiv. und absorb. Serum | | | | |

Phagocytoseraten nach 5 Minuten (Abb. 5a) und 10 Minuten (Abb. 5b) in den Kontrollansätzen und bei 1% Gammaglobulinpräparaten. Bei den Präparaten gibt jeweils die linke Säule den Ansatz mit 10% Antikörper - absorbiertem Serum als zusätzlicher Komplementquelle wider.

Abb. 5c : Gammaglobuline 1 % - Phagocytoseindex nach 5 Minuten



Abb. 5d : Gammaglobuline 1 % - Phagocytoseindex nach 10 Minuten



	Frischserum		Intraglobulin	IgG prop
	Hank's Lösung		γ-Venin	IgG pepsin
	absorb. Serum		Schura	IgG nativ
	inaktiv. Serum		Rhodiglobin	IgG plasmin
	inaktiv. und absorb. Serum			

Phagocytoseindizes nach 5 Minuten (Abb. 5c) und 10 Minuten (Abb. 5 d) in den Kontrollansätzen und bei 1% Gammaglobulinpräparaten. Bei den Präparaten gibt jeweils die linke Säule den Ansatz mit 10% Antikörper - absorbiertem Serum als zusätzlicher Komplementquelle wider.

3.2.3. Untersuchung der Gammaglobulinpräparate in 5%-iger Konzentration

In der Vermutung, eine verminderte Avidität der Antikörper in den Präparaten könne sich durch eine größere Menge ausgleichen lassen, wird die Endkonzentration der Gammaglobuline in diesen Versuchen auf 5% erhöht, einen bei klinischer Anwendung allerdings unerreichbaren Anteil.

In diesem Sonderfall (siehe Abb. 6 a-d) stellt sich bei den ungespaltenen, mit β -Propiolacton (Intraglobin) bzw. Polyäthylenglykol und Hydroxyäthylstärke (PEG/HES, Immun Schura) behandelten Präparaten eine Verbesserung gegenüber dem 1%-igen Ansatz dar.

Als wirkungsvollste Substanz zeitigt die β -Propiolacton-behandelte Zubereitung allein eine Wirkung, die der von absorbiertem und inaktiviertem Serum vergleichbar ist. Bei Komplement-zusatz entspricht ihr Effekt nahezu dem der intakten Antikörper in inaktiviertem Serum: Die Phagocytoserate beträgt dann 38% gegenüber 49% bei inaktiviertem Serum nach 5 Minuten Phagocytosedauer und 51% gegenüber 59% nach 10 Minuten). Das mit PEG/HES behandelte Präparat kann Komplement nicht in diesem Ausmaß nützen: Die Phagocytoserate liegt ohne Komplementzusatz nach 5 Minuten bei 17% und nach 10 Minuten bei 18% , mit Komplement nach 5 Minuten bei 28% und nach 10 Minuten bei 32%.

Bei den enzymgespaltenen Produkten machen sich durch Konzentrationserhöhung überwiegend störende Einflüsse bemerkbar, bei beiden Präparaten in etwa gleichem Ausmaß: Die Granulocyten phagocytieren in den Proben schlechter als im Kontrollansatz mit Hank's Lösung, die Phagocytoserate sinkt jeweils um etwa 10%. Eine wertbare Steigerung läßt sich durch Komplementzusatz nicht erzielen.

Abb. 6a : Gammaglobuline 5 % - Phagocytoserate nach 5 Minuten



Abb. 6b : Gammaglobuline 5 % - Phagocytoserate nach 10 Minuten



Phagocytoseraten nach 5 Minuten (Abb. 6a) und 10 Minuten (Abb. 6b) in den Kontrollansätzen und bei 5% Gammaglobulinpräparaten. Bei den Präparaten stellt jeweils die linke Säule den Ansatz mit 10% Antikörper - absorbiertem Serum als zusätzlicher Komplementquelle dar.

Abb. 6c : Gammaglobuline 5 % - Phagocytoseindex nach 5 Minuten



Abb. 6d : Gammaglobuline 5 % - Phagocytoseindex nach 10 Minuten



- | | | | | | |
|--|----------------------------|--|-------------|--|-------------|
| | Frischserum | | Intraglobin | | IgG prop |
| | Hank's Lösung | | γ-Venin | | IgG pepsin |
| | absorb. Serum | | Schura | | IgG nativ |
| | inaktiv. Serum | | Rhodiglobin | | IgG plasmin |
| | inaktiv. und absorb. Serum | | | | |

Phagocytoseindices nach 5 Minuten (Abb. 6c) und 10 Minuten (Abb. 6d) in den Kontrollansätzen und bei 5% Gammaglobulinpräparaten. Bei den Präparaten stellt jeweils die linke Säule den Ansatz mit 10% Antikörper - absorbiertem Serum als zusätzlicher Komplementquelle dar.

4. Diskussion

4.1. Diskussion von Material und Methode

In dieser Arbeit wird mit einer in-vitro Methode die opsonisierende Wirkung von sieben handelsüblichen intravenös anwendbaren immunglobulinhaltigen Präparaten untersucht. Auf die eingeschränkte Aussagekraft von Ergebnissen, die in vitro gewonnen werden, für die tatsächlichen Verhältnisse bei Keimaufbereitung und Phagocytose in vivo ist oft hingewiesen worden (1, 4, 61, 68, 70).

Dennoch sind in-vitro Studien unerlässlich und liegen insbesondere zu Serumkonserven nur unzureichend vor. Sowohl der meßbare Proteinspiegel an Immunglobulinen als auch die Bestimmung der Antikörpertiter mit serologischen Methoden erlauben keine verlässliche Aussage über biologische Funktionsfähigkeit und tatsächliche Schutzwirkung der nachgewiesenen Immunglobuline bzw. Antikörperstrukturen (5, 42, 47, 69).

Phagocytosemodelle erfassen dagegen die Reaktionsfähigkeit der Antikörper im Zusammenwirken mit dem Komplementsystem und den phagocytierenden Zellen. Sie stellen also einen großen Teil der natürlichen Verhältnisse dar. Dennoch gibt es Versuche, in denen Phagocytosemodelle andere Ergebnisse bringen als in-vivo Studien (1, 68), weil sie in der Regel die intravasalen Verhältnisse imitieren, nicht jedoch die Vorgänge im Gewebe (61).

Das hier gewählte Modell soll die intravasale Situation bei einer Bakteriämie wiedergeben: Die natürlichen Antikörper gegen den Erreger reichen für eine effektive Keimeliminierung nicht aus - entweder wegen eines hohen Verbrauchs oder wegen mangelhafter Neubildung - , die Komplementfaktoren sind intakt, können jedoch vermindert sein und die Granulocyten sind meist in ihrer Funktion nicht eingeschränkt.

Nach den Untersuchungen von Björkstén (8), Lehrer (33) und Midvedt (40) stellt die durch Serumfaktoren vermittelte Erkennung und Aufbereitung eines Keims sowie die anschließende Phagocytose durch Granulocyten den kritischen Schritt der Bakterizidie dar; die weitere intrazelluläre Abtötung ist von Serumfaktoren unabhängig. Eine Abhängigkeit auch dieses Vorganges von Serumbestandteilen stellen jedoch Solberg (65) und Leijh (34) bei *S. aureus* fest. Bei gesunden Granulocyten ist eine ausreichende Abtötungsfähigkeit gewährleistet, außer bei extrem hoher Keimmenge von mehr als 100 Keimen pro Granulocyt (66).

Da die intrazelluläre Eliminierung einen energieverbrauchenden Vorgang darstellt (30), sind Messungen des O_2 -Verbrauches, der Reduktion des Farbstoffes Nitroblautetrazolium (NBT) und die Chemolumineszenz als Maß für den phagocytoseassoziierten oxidativen Metabolismus möglich. Sie ergeben allerdings nur einen indirekten Parameter über die Phagocytose.

Als weitere Methode, das Ausmaß der Phagocytose zu kontrollieren ist die radioaktive Markierung der Bakterien und anschließende Messung der von Granulocyten inkorporierten Radioaktivität beschrieben. Dieses Verfahren wird wegen des weitaus komplizierteren Vorgehens hier nicht angewendet.

In dieser Untersuchung ist ein Phagocytosemodell gewählt, in dem die Phagocytose in einem möglichst vollblutähnlichen Milieu abläuft und anschließend mikroskopisch beurteilt wird : Im Unterschied zu anderen Modellen sind in diesem Ansatz alle korpuskulären Bestandteile des Vollblutes in normaler Konzentration belassen. Dadurch sind die Granulocyten, wie auch intravasal, in ihrer Keimsuche behindert (50). Das unterschiedliche Ausmaß der Opsonisierung kann so deutlicher zu Tage treten als bei hoher Konzentration von Keimen und Granulocyten, wo zur Phagocytose je nach Keimart wenig oder keine Opsonisierung nötig ist (7).

Die bei der Granulocyten-gewinnung verbleibende Konzentration an Restplasma von maximal 0,35% liegt unter der für *S. aureus* als opsonisierend beschriebenen Dichte von 1% (16).

Auch die bei der Blutabnahme dem Vollblut zugesetzte Menge Heparin (5 IE/ ml) wird beim Waschen der Blutkörperchen entsprechend verdünnt. Die bekannte Beeinträchtigung der Komplementaktivierung auf dem klassischen und dem alternativen Weg durch Heparin kann sich somit nicht auswirken : Sie macht sich erst bei Heparinkonzentrationen ab 30 U/ml bemerkbar (71).

Die gewählte Methode der Granulocyten-gewinnung erlaubt eine kurze Präparationsdauer und vermindert das Verklumpen der weißen Blutzellen mit zunehmender Alterung. Beim Phagocytosevorgang ist eine solche Tendenz zur Aggregation ab 15 Minuten Inkubationsdauer ohnehin zu beobachten (23, 36). Bei der angewandten mikroskopischen Auswertung kann zugleich die Kontrolle über Aggregate von Keimen bzw. Granulocyten durchgeführt werden, die in den hier beschriebenen Versuchen auch wegen der Beschränkung der Inkubationszeit auf 10 Minuten nicht in nennenswertem Ausmaß registrierbar sind.

Bei der Definition des Phagocytoseindex (als das Verhältnis von Zahl der inkorporierten Keime pro Phagocyt; siehe 2.6.) ist zu bedenken, daß der Index bei niedrigen Phagocytoseraten für eine zusätzliche Aussage über den Umfang der Phagocytose nicht verwendbar ist : Wenn nur ein Granulocyt zwei Keime aufgenommen hat erscheint die Phagocytose ebenso gut wie in der Situation, wo 50% der Granulocyten je zwei Keime eliminieren. Die Definition des Index als durchschnittlich phagocytierte Keimzahl je 100 ausgezählter Granulocyten erscheint andererseits allein auch nicht ausreichend aussagekräftig.

Der verwendete Keim *S. aureus* entstammt klinischem Untersuchungsmaterial. Der Gehalt seiner Zellwand an Protein A (PA), einem wesentlichen Wandbestandteil (63) ist nicht gesondert untersucht. Dies geschieht auch im klinischen Alltag nicht. PA läßt sich bei über 90% der *S. aureus*-Stämme nachweisen (49), wenngleich in unterschiedlichem Ausmaß (13). Seine besondere Eigenschaft, über die C_H2 - und C_H3 -Domäne des Fc-Teils unspezifisch mit IgG der Subklassen 1, 2 und 4 zu reagieren (17, 32, 62) und dabei auch das Komplementsystem als zusätzliches Opsonin zu aktivieren (49, 63), läßt eine unterschiedliche Opsonisierung durch die verschiedenen Opsoninquellen möglich erscheinen. Da die Fähigkeit von IgG, an PA zu binden, allgemein als ein wichtiges Kriterium für die Intaktheit des IgG-Moleküls angesehen wird (45, 64), können auch unspezifische, aber funktionell unbeeinträchtigte Immunglobuline eine zusätzliche Opsonisierung bewirken (46). Jedoch wird auch über eine gute Opsonisierung von PA-losen Stämmen berichtet (46).

4.2. Diskussion der Ergebnisse

In einem Modell wird der Einfluß von verschiedenen i.v.-anwendbaren immunglobulinhaltigen Präparaten auf die Phagocytoseleistung eines an Serumproteinen verarmten Erwachsenenblutes getestet. Dabei wird ein besonderes Augenmerk auf die Geschwindigkeit der Phagocytose gelegt und die Leistung der Präparate mit dem entsprechenden Einfluß von frischem Serum, intakten Antikörpern in inaktiviertem Serum sowie Komplementfaktoren verglichen. Dabei zeigt sich folgendes:

1. Die geringe, überwiegend sogar fehlende Opsoninwirkung steht in keinem Verhältnis zur proteinchemisch meßbaren Immunglobulinmenge.

2. Nur eine Serumkonserve (Schura) kann die Granulocyten-eigenleistung deutlich steigern, die beiden anderen (Biseko und Seretin) können dies nur mit einer zusätzlichen Komplementquelle.
3. Kein Gammaglobulinpräparat führt in einer therapeutisch erreichbaren IgG-Konzentration zu einer Opsonisierung, es überwiegen die hemmenden Einflüsse. Diese Störfaktoren wirken sich bei Erhöhung der Konzentration auf ein therapeutisch niemals erreichbares Niveau bei den enzymgespaltenen Präparaten noch deutlicher aus, bei den ungespaltenen läßt sich die Hemmung durch eine zusätzliche Komplementquelle aufheben bzw. überlagern. Komplement wirkt demnach mit den ungespaltenen Gammaglobulinen und den Granulocyten zusammen.
4. Bei Vernachlässigung des Zeitfaktors, also bei einer in anderen Phagocytosemodellen gewählten langen Reaktionszeit für die Antigen- Antikörperbindung (16, 35, 65, 72) treten unterschiedliche Opsoninwirkungen weitaus weniger zu Tage. Dies zeigt sich bei den Untersuchungen mit zusätzlicher Vorinkubation der Keime in den jeweiligen Opsoninquellen.

Als Vergleichsmaßstab werden in dieser Untersuchung folgende Opsoninquellen untersucht :

1. Frischserum
2. intakte Antikörper in inaktiviertem Serum
3. Komplementfaktoren in mit *S. aureus* Antikörper-absorbiertem Serum
4. Hank's Lösung.

Aus diesen Kontrollansätzen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Der verwendete Keim *S. aureus* wird auch in plasmafrei gewaschenem Blut phagocytiert. Dies steht in Widerspruch zu Ergebnissen, nach denen Granulocyten *S. aureus* nicht

ohne Opsoninzusatz phagocytieren können (24, 39). Die Restplasmakonzentration von maximal 0,35 % liegt im hier beschriebenen Ansatz deutlich unter dem Wert von 1%, der von Eibl bei *E.coli* als phagocytosefördernd angegeben wird (16). Es erscheint also möglich, daß intakte Antikörper bei *S. aureus* auch in derart geringfügiger Konzentration wirksam sind.

2. Das komplementhaltige Serum, das mit *S. aureus* absorbiert und somit arm an spezifischen Antikörpern ist wirkt sich deutlich fördernd auf die Phagocytoserate aus (Granulocyte-eigenleistung plus 10%). Aus den Vorversuchen läßt sich schliessen, daß nach Absorption nur noch wenige Restantikörper zurückbleiben: Unterzieht man dieses Serum einer zusätzlichen Inaktivierung, so findet man im Vergleich zur Granulocyte-eigenleistung in Hank's Lösung keine verbesserte Keimaufnahme.

Der phagocytosefördernde Effekt des komplementhaltigen, antikörperarmen Serums ist in mehrfacher Weise erklärbar: Wenn auch nur eine sehr geringe Zahl an spezifischen und in ihrer Avidität wenig eingeschränkten Antikörpern enthalten ist , läßt sich wegen der synergistischen Wirkung von Antikörpern und dem Komplementfaktor C3b (15, 20, 21) eine deutliche Phagocytose beobachten und zwar insbesondere dann, wenn das Immunglobulin sich rasch und noch vor der Bindung von C3b auf den Bakterien angelagert hat (27). Darüberhinaus kann eine opsonisierende Komplementaktivierung durch Komplexe von Protein A und intakten unspezifischen IgG-Molekülen eingeleitet werden (19, 63). In einem Medium mit IgG-Mangel kann *S. aureus* Komplement auch über den alternativen Weg aktivieren (74). Die hierfür nötigen Elektrolyte, vor allem Mg^{++} -Ionen sind im hier beschriebenen Versuchsansatz durch Verwendung der Hank's Lösung ausreichend vorhanden.(31).

3. Intakte Antikörper stellen offensichtlich das wirksamste Opsonin für *S. aureus* dar (9, 26, 46, 49, 65). Wirksam können dabei sowohl die spezifisch gegen *S. aureus* gerichteten Antikörper sein als auch die Immunglobuline, die unspezifisch mit dem Protein A der Bakterienwand reagieren (19) und damit über eine Reaktion mit dem Fc-Rezeptor des Phagocyten die Keimaufnahme vermitteln können (29, 37, 39).
4. Bei der Vorinkubation des Keims in antikörperarmem, mit *S. aureus* absorbiertem Serum läßt sich im Vergleich zur Wirkung der Vorinkubation in den anderen Kontrollansätzen (Frischserum, inaktiviertes Serum, Hank's Lösung) die deutlichste Steigerung der Phagocytoseleistung bewirken: Eine Verlängerung der Inkubationszeit kann also einen quantitativen Mangel an Immunglobulinen verschleiern. Ein gleichartiger Effekt läßt sich auch bei einem qualitativen Mangel der Antikörper beobachten, der ebenfalls durch Vorinkubation weniger deutlich erscheint. Dies zeigen die parallel durchgeführten Untersuchungen an *E. coli* (12) und *Candida albicans* (48).

Bei der kurzen Reaktionszeit, die in den hier beschriebenen Versuchen an gammaglobulinhaltigen Präparaten gewählt ist, zeigt sich, daß kein Produkt auch nur annähernd an die Opsoninwirkung intakter Antikörper in Frischserum oder inaktiviertem Serum heranreicht. Dies gilt sowohl für Serumkonserven als auch für intravenös applizierbare Gammaglobulinpräparationen.

Bei den Serumkonserven bewirkt lediglich die Zubereitung von Schura (SUR) eine nennenswerte Opsonisierung. Allerdings ist der Gehalt dieser Konserve an IgG, IgA, IgM, freiem Transferrin und Gesamttransferrin im Vergleich zu den beiden anderen Präparaten etwa verdoppelt (siehe Tab. 4).

IgM weist eine außerordentlich hohe Affinität zu einigen Antigenen auf (11, 22, 70) und zeigt sich auch als wirksam für die Opsonisierung von *S. aureus* (65). Möglicherweise bedingt der erhöhte IgM-Gehalt von SUR die beobachtete Wirkung,

obwohl über die biologische Aktivität des enthaltenen IgM auf Grund der meßbaren Immunglobulinmenge allein keine Aussage getroffen werden kann, da dabei z.B. die Menge von IgM-Aggregaten unbestimmt bleibt.

Die unterschiedliche Konzentration von IgA dürfte keine Rolle bei den unterschiedlichen Opsoninleistungen spielen: IgA wirkt nicht opsonisierend (68), obwohl es fester an Protein A von *S. aureus* binden kann als IgG oder IgM (22, 43).

Bei Phagocytoseversuchen mit *E. coli* läßt sich eine Beziehung der Opsonisierung von Serumkonserven zu deren Eisengehalt herstellen (12): Die Konserve mit dem niedrigsten Fe^{++} -Gehalt und über 90 % ungesättigtem Transferrin opsonisierte *E. coli* und *Klebsiella* am besten. Bei dem grampositiven Keim *S. aureus* spielt das für gramnegative Keime wichtige Fe-Ion (6) wohl nur eine untergeordnete Rolle.

Die Immunglobuline aller drei Serumkonserven, die selbst inaktiviert sind, können zugegebenes Komplement zur weiteren Phagocytoseförderung verwerten. Allerdings ist dies nur in vergleichsweise geringem Ausmaß und als träge Reaktion möglich: Die durchschnittliche Steigerung der Phagocytoserate beträgt nach 10 Minuten 5%, nach 5 Minuten kann nur SUR Komplement ausnützen. Dies spricht dafür, daß bei den verschiedenen Aufbereitungsprozessen eine Beeinträchtigung der über den Fc-Teil vermittelten Funktionen eintritt.

Für die Gammaglobulinpräparate lassen sich folgende Interpretationen der Befunde entwickeln:

Weder die enzymatisch gespaltenen noch die ungespaltenen Präparate zeigen in einer der normalen IgG-Konzentration entsprechenden Menge einen opsonisierenden Effekt.

Die antiphagocytäre Wirkung des pepsingespalteten Produkts läßt sich durch Zugabe von Komplementfaktoren in 10% Antikörper-absorbiertem Serum ausgleichen. Vermutlich kommt hier zum Tragen, daß F(ab)_2 -Spaltprodukte den alternativen Weg des Komplements aktivieren können (1, 53, 55, 56), in niedriger Dosierung deutlicher als in höheren Konzentrationen (53).

Bei einem Versuch mit der physiologischen Menge von etwa 1% IgG, das zu 90% pepsingespalten ist, wird der hemmende Effekt der $F(ab)_2$ -fragmente durch Komplementzugabe weitgehend ausgeglichen. Bei dem Versuch, den vermuteten Mangel der Antikörper an Avidität durch eine - in der klinischen Situation unerreichbare - Konzentrationserhöhung auf 5% IgG auszugleichen, überwiegen wiederum die hemmenden Faktoren.

Nur bei in-vivo Untersuchungen ist eine Bakterizidiesteigerung von *S. aureus* durch pepsingespaltenes Immunglobulin beschrieben (35).

Auch das plasmingespaltene Gammaglobulin beeinflusst die Phagocytose eher nachteilig. Hier können zusätzliche Komplementfaktoren jedoch keine Verbesserung bewirken. Wie bei pepsingespaltenem so ist auch bei plasmingespaltenem IgG bekannt, daß es den alternativen Komplementweg aktivieren kann (38). Dennoch läßt sich in dem gewählten Modell keine Phagocytosesteigerung beobachten, obwohl der alternative Weg der Komplementkaskade weder durch einen Mangel an Mg^{++} noch durch die verschwindend geringe Menge von Heparin blockiert sein dürfte (18). Van Oss (46) findet in einem in-vitro-Versuch mit monovalenten Plasmin-F ab- fragmenten aus einem Serum mit spezifischen Antikörpern gegen *S. aureus* ebenfalls eine etwas verschlechterte Phagocytose als es der Granulocyteeigenleistung entspricht. Die plasminresistenten IgG-Subklassen 1, 2 und 4 (4), die jeweils auch gut mit Protein A reagieren können (64) scheinen über die unspezifische Bindung keine ausreichende Opsoninwirkung ausüben zu können.

Bei den ungespaltenen Immunglobulinen ist die Fähigkeit, Komplementfaktoren für eine verbesserte Opsonisierung zu aktivieren, erst in einer Konzentration von 5% IgG deutlich zu registrieren. Der klassische Weg des Komplementsystems wird durch die Bindung des Faktors C1 an der C_{H2} -Domäne des Fc-Teils ausgelöst (28, 29, 54). Durch die Behandlung mit β -Propiolacton erfährt der Fc-Abschnitt angeblich keinen Wirkungsverlust für die Komplementfixierung in Anwesenheit von Antigenen (69).

Auch bei Gammaglobulinen, die mit PEG/HES vorbehandelt sind, wird als ein Kriterium für einen funktionell intakten Fc-Teil eine hohe Affinität des Moleküls beschrieben, sich an Protein A der Staphylococci zu binden. Daher läßt sich eine erhaltene Fähigkeit zur Komplementaktivierung vermuten.

Dennoch wirkt sich die Zugabe von Komplement bei den ungespaltenen Präparaten erst in höheren, in Wirklichkeit unerreichbaren Konzentrationen von 5% Gammaglobulin aus. In nahezu physiologischer Dosierung ist wie bei den enzymgespaltenen Zubereitungen keine Verbesserung der Granulocytenleistung zu beobachten, wenn Phagocytosezeiten zugrunde gelegt werden, wie sie für Normalserum ausreichen.

Als Erklärung für die fehlenden, zum Teil auch antiphagocytären Effekte wird die unspezifische Blockierung der Fc-Rezeptorstrukturen auf Granulocyten durch Bestandteile diskutiert, die selber nicht opsonisierend wirken können. Eine solche Blockade durch Fc-Fragmente und IgG aus der Cohn-Fraktion II wird von mehreren Autoren bei Phagocytoseversuchen mit *S. aureus* (9, 39, 46) als auch *E. coli* (16) angenommen.

Die fehlende Opsonisierung des Testkeims auch durch ungespaltene Immunglobulinpräparationen legt nahe, als Ursache ebenfalls blockierende Bestandteile anzunehmen. Im Rahmen dieser Versuchsreihe zeigt sich tatsächlich eine verbesserte Phagocytose von *Candida albicans*, wenn man den Keim nach der Vorinkubation von überschüssigem, nicht keimgebundenem, β -Propiolacton-behandeltem Immunglobulin freiwäscht (48).

In-vivo kann die Beseitigung störender Komponenten durch das reticuloendotheliale System vermutet werden. Damit wären zum Teil die unterschiedlichen Ergebnisse erklärbar, die bei der Untersuchung der Phagocytose in-vivo und in-vitro gefunden werden (1, 4, 10, 35, 61, 68, 69).

Insgesamt zeigt sich also, daß im gewählten Modell alle getesteten handelsüblichen immunglobulinhaltigen Präparate eine im Vergleich zu intakten Antikörpern in Frischserum und inakti-

viertem Serum schlechte Phagocytoseleistung bewirken. Es gibt Hinweise sowohl für einen deutlichen Aviditätsverlust der Antikörper als auch auf die Beimengung von antiphagocytär wirksamen Strukturen in den untersuchten Zubereitungen. Die Serumkonserven sind bei der Opsonisierung von *S. aureus* den intravenös anwendbaren Gammaglobulinpräparaten leicht überlegen. Der Unterschied fällt jedoch nicht so deutlich aus wie in den parallel durchgeführten Untersuchungen mit den Keimen *E. coli* (12) und *Candida albicans* (48). Bei diesen Erregern wirken sich vermutlich die zusätzlichen Antikörper der IgM- und IgA-Klasse in den Serumkonserven deutlicher als Opsonine aus.

5. Zusammenfassung

Vier Gammaglobulinpräparate zur intravenösen Anwendung und drei Serumkonserven werden an Hand des grampositiven Testkeims *S. aureus* auf ihre opsonisierenden Fähigkeiten untersucht. Die Phagocytoseförderung durch inaktiviertes Serum wird als Maß für die durch intakte Antikörper erreichbare Opsonisierung mitbestimmt. Das gewählte Phagocytosemodell soll die intravasal herrschenden Verhältnisse weitgehend widergeben.

Bei allen geprüften Produkten zeigt sich eine gegenüber inaktiviertem Serum deutlich herabgesetzte Opsonisierung, wenn vergleichbare Mengen an Immunglobulin G eingesetzt werden. Nur eine der drei Serumkonserven, deren Gehalt an Immunglobulinen verdoppelt ist, vermag die Eigenleistung der Granulocyten nachhaltig zu verbessern. An die Opsoninwirkung eines gleichen Volumens von inaktiviertem Serum reicht sie jedoch nicht heran.

Bei physiologischer Dosierung der Gammaglobuline scheinen hemmende Faktoren eine Rolle zu spielen. Diese lassen sich bei ungespaltenen Immunglobulinen durch Konzentrationserhöhung auf eine klinisch jedoch irrelevante Dosis überwinden, bei enzymgespaltenen Immunglobulinen dadurch verstärken. Mit Hilfe eines Komplementzusatzes verbessern die Präparate in unterschiedlichem Ausmaß die Phagocytose.

Die gewonnenen Ergebnisse lassen auf eine deutliche Verminderung der Avidität von Antikörpern durch die jeweiligen Herstellungsverfahren schließen. Diese Beeinträchtigung kommt bei Untersuchungen mit langer Reaktionszeit, wie bei serologischen Tests, nicht zum Tragen.

Für die klinische Anwendung läßt sich aus der vorliegenden Arbeit folgern, daß die empfohlenen Dosierungen zur Substitutionstherapie bei schweren bakteriellen Infektionen erhöht werden sollten.

Außerdem lassen die Resultate eine Vorauswahl der anzuwendenden Präparate zu: Wie auch in Parallelversuchen an *Candida albicans* und *Escherichia coli* gezeigt, erweisen sich Serumkonserven den Gammaglobulinpräparaten überlegen. Dies gilt bei dem Keim *S.aureus* insbesondere für die Konserve mit verdoppeltem Immunglobulingehalt.

6. Literatur

1. AX W., KANZY E.-J., GORONZI B., SEILER F.R.:
Beeinflussung von in-vitro Phagocytose und in-vivo
Bakterienelimination durch Immuns serum, IgG und den
verschiedenen daraus hergestellten IgG-Fragmenten
Verhandlungen der dt. Gesellschaft für Innere Medizin
84: 1325-1331, 1978
2. BAIRD-PARKER A.C.: Classification and Identification of
Staphylococci and Their Resistance to Physical Agents
In: The Staphylococci, New York 1972
3. BARANDUN S., KISTLER P., JEUNET F., ISLIKER H.: Intravenous
Administration of Human Gammaglobulin
Vox Sang. 7: 157-174, 1962
4. BARANDUN S., CASTEL V., MAKULA M.F., MORELL A., PLAN R.,
SKAVRIL F.: Clinical Tolerance and Catabolism of
Plasmin-Treated γ -Globulin for Intravenous Application
Vox Sang. 28: 157-175, 1975
5. BARANDUN S., SKAVRIL F., MORELL A.: Prophylaxe und Therapie
mit γ -Globulin
Schweiz. med. Wschr. 106: 533-542, 580-586, 1976
6. BAUER H.W., MELLIN H.-E., GRABS G.-H.: Über die Bedeutung
der postoperativen Zufuhr von Plasmaproteinen
Infusionstherapie 6: 301-304, 1980
7. BERTO R., MENZEL J.: The Interaction of Opsonins with Human
Polymorphonuclear Leucocytes (PMN). The Influence of
Human Complement (C) and IgG on Ingestion and
Digestion of C-Resistant E.Coli
Z. Immun.-Forschung vol. 155: 189-199, 1979
8. BJÖRKSTEN B., PETERSON P.K., VERHOEF J., QUIE P.G.:
Limiting Factors in Bactericidal Phagocytosis
by Human Polymorphonuclear Leucocytes
Acta path. microbiol. scand. Sect. C, 85: 345-349, 1977
9. CHRISTIE K.E., SOLBERG C.O., LARSEN B., GROV A., TONDER O.:
Influence of IgG, F(ab')₂ and IgM on the Phagocytic
and Bactericidal Activities of Human Neutrophil
Granulocytes
Acta path. microbiol. scand. Sect. C, 84: 119-123, 1976

10. COOPERATIVE GROUP OF ADDITIONAL IMMUNOGLOBULIN THERAPY
IN SEVERE BACTERIAL INFECTIONS: Multicenter
Randomized Controlled Trial on the Efficacy of
Additional Ig-Therapy in Cases of Diffuse Fibrino-
Purulent Peritonitis
Klin. Wschr. 61: 445-450, 1983
11. DEICHER H.: International Forum: Which is the Factual Basis
in Therapy and Clinical Practice for the Use of
Intravenous Gammaglobulin in the Treatment of Severe
Bacterial Infections
Vox Sang. 37: 119-120, 1979
12. DEIXLER E.: Wirkung unterschiedlich hergestellter i.v.-
applizierbarer Serumeiweißkonserven und Gammaglo-
bulinpräparate auf die in-vitro-Phagocytose von
E. coli durch neutrophile Granulocyten
Dissertation München, 1983
13. DOSSET J.H., KRONVALL G., WILLIAMS R.C., QUIE P.G.:
Antiphagocytic Effects of Staphylococcal Protein A
J. of Immunology 103: 1405-1411, 1969
14. DUSWALD K.H., MÜLLER K., SEIFERT J., RING J.:
Wirksamkeit von i.v. γ -Globulinen gegen bakterielle
Infektionen chirurgischer Patienten
MMW 122: 832-836, 1980
15. EHLENBERGER A.G., NUSSENZWEIG V.: The Role of Membrane
Receptors for C3b and C3d in Phagocytosis
The J. of Exp. Med. 145: 357-371, 1977
16. EIBL M., FRIERS G.: Hemmung der Opsonisierung von E. coli
durch enzymatisch gespaltene Gammaglobuline
Wiener Klin. Wschr. 90: 717-721, 1978
17. ENDRESEN C., GROV A.: Further Characterisation of Protein A
Reactive and Non-reactive Subfragments of Fc from
Human IgG
Acta path. microbiol. scand. Sect. C 84:397-402,
1976
18. FEARON D.T., AUSTEN K.F.: The Alternative Pathway of
Complement - A System for Host Resistance to
Microbial Infections
The N.Engl. J. of Med. 303: 259-263, 1980

19. FORSGREN A., QUIE P.G.: Influence of the Alternate Complement Pathway on Opsonisation of Several Bacterial Species
Infect. and Immunity 10: 402-404, 1974
20. FRIES L.F., GAITHER TH.A., HAMMER C.H., FRANK M.M.: C3b Covalently Bound to IgG Demonstrates a Reduced Rate of Inactivation by Factors H and J
J. of Exp. Med. 160: 1640-1655, 1984
21. HAKANSSON L., VENGE P.: Studies on the Co-operation Between the Fc and C3b Receptors
Immunology 47: 687-694, 1982
22. HARBOE M., FÖLLING I.: Recognition of Two Distinct Groups of Human IgM and IgA Based on Different Binding to Staphylococci
Scand. J. Immunol. 3: 471-482, 1974
23. HENRICKS P.A.J., VAN DER TOL M.E., VERHOEF J.: Aggregation of the Human Polymorphonuclear Leucocytes During Phagocytosis of Bacteria
Immunology 52: 671-678, 1984
24. HIRSCH J.G., STRAUSS B.: Studies on Heat-Labile Opsonin in Rabbit Serum
J. of Immunology 92: 145-154, 1964
25. HITZIG W.H.: Immunglobuline in der Therapie
Therapiewoche 26: 3490-3503, 1976
26. HUMPHREYS D.W., WHEAT L.J., WHITE A.: Staphylococcal Heat-Stable Opsonins
J. Lab. Clin. Med. 84: 122-128, 1974
27. JOINER K.A., GOLDMAN R.C., HAMMER C.H., LEVINE L., FRANK M.M.: Studies on the Mechanism of the Bacterial Resistance to Complement-Mediated Killing
J. Immunology 131: 2570, 1983
28. JOHANNSSEN R., ENDERS B., SEILER F.R.: Hemolytic and Lymphocytic Properties of F(ab')₂-Fragments of Antibodies: Activation of Complement Via the Alternate Pathway
Z. Immunol. Forsch., exp. Therapie 153: 313-314, 1977

29. JOHNSTON R.B., STROUD R.M.: Complement and Host Defense
Against Infection
The J. of Pediatrics 90: 169-179, 1977
30. KLEBANOFF S.J. : A Peroxidase-Mediated Antimicrobial
System in Leucocytes
J. Clin. Invest. 46: 1078, 1967
31. KÖNIG W., BITTER-SUERMANN D., DIERICH M., HADDING U.:
Bypass-Activation of the Complement System Starting
With C3-II. C3-Activation by Gamma-1-Immune
Aggregates in Guinea Pig Serum
Immunochemistry 10: 431-437 , 1973
32. KRONVALL G., FROMMEL D.: Definition of Staphylococcal
Protein A Reactivity for Human IgG-Fragments
Immunochemistry 7: 124-127, 1970
33. LEHRER R.I., CLINE M.J.: Interaction of Candida Albicans
With Human Leucocytes and Serum
J. of Bacteriology 98: 996-1004, 1969
34. LEIJH P.C.J., VAN DEN BARSCHAAR M.T., VAN ZWET T.L.,
DAHA M.R., VAN FURTH R.: Requirement of Extracellular
Complement and Immunoglobulin for Intracellular
Killing of Microorganisms by Human Monocytes
J. of Clinical Investigation 63: 772-784, 1979
35. LINDQUIST L., JARSTRAND C., LUNDBERGH P.: Granulocytic
Function after Administration of Pepsin-Treated
Human Gammaglobulin
Infection 6: 248-251, 1978
36. MAGNUSSON K.E., DAHLGREN C., STENDAHL O., SUNDQUIST T.:
Characteristics of the Phagocytic Process Assessed
by Coulter Counter
Acta path. microbiol. Scand. Sect.C 85: 215-221, 1977
37. MANTOVANI B.: Different Roles of IgG and Complement Receptors
in Phagocytosis by PMN Leucocytes
J. of Immunology 115: 15-17, 1975
38. MASUDA K., MAKULA M.F., OKUYAMA K., ISHIYAMA H., YASUDA I.:
Antibody Spectrum and Anticomplementary Activity of a
Plasmin-Treated Human Immunoglobulin Preparation
Vox Sang. 42: 8-15, 1982

39. MESSNER R.P., JELLINEK J.: Receptors for Human γ G-Globulin on Human Neutrophils
J. of Clin. Invest. 49: 2165-2171, 1970
40. MIDVEDT T., BAARDSEN A.: Elimination of Ingested 32 P-labeled E. Coli from Rat PMN Neutrophils
Acta path. microbiol. scand. Sect.C 84: 100-104, 1976
41. MORELL A., SKAVRIL F.: Struktur und biologische Eigenschaften von Immunglobulinen und γ -Globulin -Präparaten
Schweiz. med. Wschr. 110: 80-85, 1980
42. MORELL A., SCHNOZ M., BARANDUN S.: Build-up and Maintenance of IgG Serum Concentrations with Intravenous Immuno-globulin in Patients with Primary Humoral Immuno-deficiency
Vox Sang. 43: 212-219, 1982
43. MYHRE E.B., KRONVALL G.: Binding of Murine Myeloma Proteins of Different Ig Classes and Subclasses to Fc-Reactive Surface Structures in Grampositive Cocci
Scand. J. Immunol. 11: 37-46, 1980
44. NIETHAMMER D., WILDFEUER A., KLEINHAEUER E., HAFERKAMP C.: Granulocyten-dysfunktionen
Klin. Wschr. 53: 643-652, 1975
45. NYDEGGER U.E.: Normal Immunglobulin: Intravenous or Intramuscular? Appropriate and Non.appropriate Doses
Vox Sang. 46 S1 : 32-34, 1984
46. VAN OSS C.J., WOEPPEL M.J., MARQUARI S.E.: Immunglobulins as Aspecific Opsonins: The Opsonizing Power of Fragments of Polyclonal and Monoclonal IgG
J. of rethiculoendothelial Society 13: 221-230, 1973
47. OURTH D.D.: Neutralization of Diphtheria Toxin by Human IgG Classes and Subunits
Immunochemistry 11: 223-225, 1974
48. PARK J.W.: Die Opsoninwirkung von drei Serumkonserven und vier Gammaglobulinen bei der Phagocytose von Candida albicans durch menschliche Granulocyten
Dissertation München 1983

49. PETERSON P.K., VERHOEF J., SABATH L.D., QUIE P.G.:
Effect of Protein A on Staphylococcal Opsonization
Infection and Immunity 15: 760-764, 1977
50. PILARS DE PILAR C.E., DEIXLER E., GRUBER N., KASTNER H.:
Einfluß von Serumkonserven auf die Serum- und Blut-
bakterizidie
Immunglobulintherapie herausgegeben von H. Deicher
und I. Stroehmann, Springer Verlag Berlin Heidelberg
New York, 1980
51. PITCHER -WILMOTT R.W., HINDOCHA P., WOOD C.B.S.:
The Placental Transfer of IgG Subclasses in Human
Pregnancy
Clin. exp. Immunol. 41: 303-308, 1980
52. PROBST M., FABIAN W.: Zum Einsatz von Immunglobulinen als
Frühtherapie nach Rektumextirpation
MMW 121: 1227, 1979
53. REID K.B.M.: Complement Fixation by the F(ab')₂-Fragment
of Pepsin-Treated Rabbit Antibody
Immunology 20: 649-658, 1971
54. RIESEN W.: Struktur und biologische Eigenschaften von
Immunglobulinen und Gammaglobulinpräparaten
Schweiz. med. Wschr. 110: 74-79, 1980
55. RING J., DUSWALD K.H.: Probleme der intravenösen Gamma-
globulintherapie
Klin. Wschr. 58: 797-809, 1980
56. SCHMIDT R.E., DEICHER H.: Indikationen zur Anwendung
intravenöser Immunglobuline
DMW 108/6: 227-230, 1983
57. SCHMIDT R.E., HARTLAPP J.H., NIESE D., ILLIGER H.J.,
STROEHMANN I.: Reduction of Infection Frequency by
Intravenous Gammaglobulins During Intensive Induction
Therapy for Small Cell Carcinoma of the Lung
Infection 12/3: 167-170, 1984
58. SCHUMACHER K., MAERKER-ALZER G., KLEINAU T., HÜGEL W.,
DALICHAU H., DIENST C., MITRENGA D.: Passive Immun-
prophylaxe der Posttransfusionshepatitis durch
Immunglobulinpräparation
DMW 107/39: 1459-1464, 1982

59. SCHWICK H.G.: A Survey of the Production of Plasma Derivates for Clinical Use
Vox Sang. 23: 82-91, 1972
60. SCRIBNER D.J., FAHRNEY D.: Neutrophil Receptor for IgG and Complement: Their Roles in the Attachment and Ingestion Phases of Phagocytoses
J. of Immunology 116: 892, 1976
61. SEDLACEK H.H., GRONSKI P., HOFSTÄTTER T., KANZY E.J., SCHORLEMMER H.U., SEILER F.R.: The Biological Properties of Immunoglobulin G and its Split Products F(ab')₂ and Fab
Klin. Wschr. 61: 723-736, 1983
62. SELL S.: Immunologie, Immunpathologie und Immunität
Verlag Chemie Weinheim, New York, 1977
63. SJÖHOLM I.: The Interaction Between Protein A and Immunoglobulin G as Studied with the Fc-Fragment of a Myeloma Protein by Circular Dichroism
FEBS letters 52: 53-56, 1975
64. SKAVRIL F., ROTH-WICKY B., BARANDUN S.: IgG Subclasses in Human γ -Globulin Preparations for Intravenous Use and Their Reactivity with Staphylococcal Protein A
Vox Sang. 38: 147-155, 1980
65. SOLBERG C.O., CHRISTEN K.E., LARSEN B., TONDER O.: Influence of Antibodies and Thermolabile Serum Factors on the Bactericidal Activity of Human Neutrophil Granulocytes
Acta path. microbiol. Scand. Sect.C 84: 112-118, 1976
66. SPEER C.P., GAHR M., JOHNSTON R.B.: Funktion neonataler neutrophiler Granulocyten
Monatsschr. Kinderheilkd. 133: 651-656, 1985
67. SPIESS H. (Hrsg.): Immunglobuline in Prophylaxe und Therapie
Deutsches Grünes Kreuz Marburg, 1977
68. STENDAHL O., TAGESSON C., MAGNUSSON K.E., EDEBO L.: Physicochemical Consequences of Opsonization of Salmonella Typhimurium with Hyperimmune IgG and Complement
Immunology 32: 11-18, 1977

69. STEPHAN W.: Intravenöse Immunglobuline, proteinchemische und immunbiologische Charakterisierung der verschiedenen Präparattypen
Immunglobulintherapie, herausgegeben von H. Deicher und I. Stroehmann, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1980
70. STROEHMANN I., SCHMIDT R.E.: Grundlagen der humoralen und zellulären Immunität in der Therapie mit Immunglobulinen
Immunglobulintherapie, herausgegeben von H. Deicher und I. Stroehmann, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1980
71. TALSTAD I.: The Relationship Between Phagocytosis of Polystyrene Latex Particles by Polymorphonuclear Leucocytes (PML) and Aggregation of PML
Scand. J. Haemat. 9: 516-523, 1972
72. TYMPNER K.D., KLOSE P.K., JANKA G., LIEGEL D.: Einfluß i.v. verträglicher Immunglobuline auf die Phagocytoseleistung der Granulocyten in vitro
MMW 120: 251-252, 1978
73. VANDENBROUCKE-GRAULS C.M.J.F., THIJSEN H.M.W.M., VERHOEF J.: Interaction Between Human Polymorphonuclear Leucocytes and Staph. aureus in the Presence and Absence of Opsonins
Immunology 52: 427-435, 1984
74. VERBRUGH H.A., VAN DIJK W.C., PETERS R., VAN ERNE M.E., DAHA M.R., PETERSON P.K., VERHOEF J.: Opsonic Recognition of Staphylococci Mediated by Cell Wall Peptidoglycan: Antibody-Independent Activation of Human Complement and Opsonic Activity of Peptidoglycan Antibodies
J. of Immunology 124: 1167-1173, 1980

Für die Überlassung des Themas und die intensive
und geduldige Betreuung meiner Arbeit meiner Arbeit
möchte ich Herrn Professor Dr. H. Spiess und
Herrn Dr. von Pilar recht herzlich danken.

Achim Krause - LEBENS LAUF

- 26.2.1956 Geburt als Sohn von Dipl. Ing. Joachim Krause
 und Ilse Krause, geb. Folkerts in München
- 1962 Einschulung in München
- 1966 Übertritt in das Karlsgymnasium München-Pasing
- 1975 Abitur am Karlsgymnasium
- 1975 Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-
 Maximilian-Universität München
- 1977 Ärztliche Vorprüfung
- 1978 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 1980 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 1981 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 23.10.1981 Approbation als Arzt
- 3/1982
- 6/1983 Ärztliche Tätigkeit an der Medizinischen Poli-
 klinik der Universität München
- 7/1983
- 1986 Ärztliche Tätigkeit an der Klinik Höhenried

